



Title	SAD : A Presynaptic Kinase Associated with Synaptic Vesicles and the Active Zone Cytomatrix that Regulates Neurotransmitter Release
Author(s)	井上, 英二
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48888
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	井 上 英 二
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 1 5 1 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 19 年 7 月 20 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	SAD : A Presynaptic Kinase Associated with Synaptic Vesicles and the Active Zone Cytomatrix that Regulates Neurotransmitter Release (SAD : シナプス小胞とアクティブゾーン細胞骨格に結合し、神経伝達物質の放出を調節するプレシナプスキナーゼ)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 高 井 義 美 (副査) 教 授 狩 野 方 伸 教 授 内 山 安 男

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

プレシナプス膜に存在するアクティブゾーンは、神経伝達物質が充填されたシナプス小胞が集積し、カルシウムイオン依存的な神経伝達物質の放出が行われている領域である。この領域には、Cytomatrix at the active zone (CAZ)と呼ばれる細胞骨格が存在し、神経伝達物質の放出を時間的・空間的に制御していると考えられている。しかしながら、シナプス小胞と CAZ を結びつけるメカニズムはこれまで明らかにされていなかった。一方、*C. elegans* SAD 変異体は CAZ 分子の局在は正常であるが、シナプス小胞のアクティブゾーンへの集積が弱くなる変異体で、その原因遺伝子は SAD-1 キナーゼというセリン・スレオニンキナーゼであるということが報告されている。したがって、この変異体ではシナプス小胞を CAZ 自身に集積させる CAZ の機能自体が損なわれている可能性が考えられた。そこで今回は、この SAD-1 と CAZ の機能との関連を明らかにする目的で、*C. elegans* SAD-1 キナーゼのヒトホモログを同定し、性状解析を行った。

[方法ならびに成績]

I. SAD cDNA のクローニングと構造決定

C. elegans SAD-1 キナーゼのヒトホモログを同定するために、EST データベースサーチを行ったところ、2 種類の相同性の高い配列を得ることができた。その配列を元にヒト脳 cDNA ライブラリーを用いてスクリーニングを行った結果、2 種類のホモログのクローニングに成功し、分子量の小さいものを SAD-A、大きいものを SAD-B と命名した。SAD は、N 末端にセリン・スレオニンキナーゼドメインを有しており、また中央 (Short conserved region ; SCR1) と C 末端 (SCR2) に異種間で保存された領域が存在していた。Northern blotting の結果、SAD-A、-B ともに脳特異的に発現していた。SAD-A、-B は、相同性が 80% 以上であるということと、発現パターンも同じであるということから同様の機能をもった分子であると推測された。そこで、今回は SAD-B の解析を中心に行った。

II. SAD の細胞内局在

抗 SAD-B 抗体を用いて免疫染色を行った結果、マウス海馬、小脳、ならびにラット海馬初代培養神経細胞におい

て、SAD-B のシグナルはプレシナプスのマーカーと完全に一致した。また、免疫電顕法により、SAD-B はシナプス小胞上に濃縮し、一部、CAZ 近傍に濃縮していた。さらに、生化学的実験から、SAD-B がシナプス小胞と CAZ に結合していることが明らかとなった。次に、SAD-B の欠失変異体を作製し、ラット海馬初代培養神経細胞に遺伝子導入し、シナプスへの局在に必要なドメインについて解析を行った。その結果、SCR2 領域がプレシナプスへの局在に必要であることが明らかとなった。

III. SAD の神経伝達物質放出における機能

SAD-B の神経伝達における機能を明らかにする目的で、ラット海馬初代培養神経細胞に全長 SAD-B、ならびにキナーゼネガティブ変異体を過剰発現させ、微小興奮性ポストシナプス電流 (mEPSC) の大きさと mEPSC の頻度を解析した。その結果、全長 SAD-B を過剰発現させると、mEPSC の大きさは Control と比較して差は認められなかったが、その頻度は約 6 倍増加した。また、SAD-B のキナーゼネガティブ変異体では逆に mEPSC の頻度が抑制された。mEPSC の頻度はプレシナプス性の、その大きさはポストシナプス性の影響を示しているとされ、SAD-B がプレシナプス性に神経伝達を制御していることが示唆された。

次に、神経伝達物質放出機構の研究に頻繁に用いられているラット上頸神経節細胞を用いて解析を行った。SAD-B のプレシナプスへの局在に必要な領域である SCR2 領域の GST 融合蛋白質を精製し、その蛋白質を、ラット上頸神経節細胞にマイクロインジェクションし、プレシナプス刺激による興奮性ポストシナプス電位 (EPSP) の変化を計測した。その結果、GST-SCR2 のマイクロインジェクションにより、EPSP が減少した。また、この減少は、プレシナプスの刺激頻度に依存しなかった。このことから、SAD はシナプス小胞のリサイクリング行程には関与していないということが示唆された。さらに、アクティブゾーンに結合している放出可能シナプス小胞集団 (Readily Releasable Pool, RRP) の量を計測するために、高張スクロース処理による EPSP の変化を計測した。その結果、GST-SCR2 のマイクロインジェクションにより、EPSP が減少した。これらの結果から、SAD-B は、RRP の形成を制御しているということが示唆された。

IV. SAD による CAZ 分子 RIM のリン酸化

CAZ 分子である RIM, Munc13-1 は、knockout マウスの解析から、RRP 形成を制御している分子であるということが知られている。そこで、これら分子の全長をカバーする GST 融合蛋白質を作製し、SAD-B が RIM および Munc13-1 をリン酸化するかどうか検討した。その結果、SAD-B は、RIM の C 末端を特異的にリン酸化した。

[総括]

私は、*C. elegans* SAD-1 キナーゼのヒトホモログを同定し、SAD-A、-B と命名した。SAD-B は、プレシナプスに局在し、シナプス小胞と CAZ に結合する性質を有していた。また、全長 SAD-B の過剰発現により、mEPSC の頻度が増加した。また、この効果には SAD のキナーゼ活性が必要であることがわかった。一方、SAD-B のプレシナプスへの局在に必要な領域である SCR2 領域をラット上頸神経節細胞にマイクロインジェクションすると、EPSP が低下し、さらに、高張スクロース処理による EPSP も低下した。さらに、SAD-B は、CAZ 分子である RIM の C 末端をリン酸化した。以上の結果から、SAD は、シナプス小胞と CAZ に結合し、RRP を調節している分子であるということが明らかとなった。また、SAD による RIM のリン酸化が RRP 形成において重要ではないかということが考えられた。

論文審査の結果の要旨

本申請者は、本研究において、プレシナプス形成の分子メカニズムを明らかにする目的で、*C. elegans* SAD-1 キナーゼのヒトホモログを 2 種類同定し、SAD-A、SAD-B と命名した。SAD-B は、プレシナプスに局在し、シナプス小胞とアクティブゾーン細胞骨格 (Cytomatrix at the Active Zone, CAZ) に結合する性質を有していた。また、SAD-B

は、アクティブゾーンにおける放出可能シナプス小胞集団 (**Readily Releasable Pool**, RRP) の形成に関与していた。さらに、SAD-Bは、CAZ分子の一つであるRIMをリン酸化した。以上の結果から、SADが、RRP形成を制御している分子であるということが明らかとなった。

本研究は、今後のこの分野の研究に極めて重要な意義を持つものと考えられる。したがって、今後の発展性や生命科学への貢献度から考え、学位授与に十分値するものと認める。